

Title	Microarray analyses of otospheres derived from the cochlea in the inner ear identify putative transcription factors that regulate the characteristics of otospheres(Abstract_要旨)
Author(s)	Iki, Takehiro
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2018-03-26
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.r13157
Right	Final publication is available at http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179901
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	伊 木 健 浩
論文題目	Microarray analyses of otospheres derived from the cochlea in the inner ear identify putative transcription factors that regulate the characteristics of otospheres (otosphere のマイクロアレイ比較解析による内耳の蝸牛幹/前駆細胞維持に関わる転写因子の同定)		
(論文内容の要旨)			
<p>難聴は疾病率の高い病気であり、世界中で 3 億 6000 万人の難聴者がいると言われている。その中の感音難聴は内耳の蝸牛有毛細胞の傷害が主な原因であり、有毛細胞は哺乳類では再生しないとされているため、症状は永続的である。一方で近年、成熟した哺乳類の前庭にある有毛細胞が培養系において、ある種の傷害を受けた後に再生したという報告や新生仔マウスの支持細胞が分裂、有毛細胞へ分化転換する能力を有しているという報告がなされ、内耳にも幹／前駆細胞が存在することが示唆された。蝸牛の幹／前駆細胞の遺伝子的特徴を把握し、効率の良い増幅法、分化法の発見に発展させることができれば、難聴研究や治療に寄与すると考えられる。</p> <p>内耳幹/前駆細胞は sphere forming assay を用いて、内耳の分化した細胞から分離できることが Heller らのグループから報告され、作製された otosphere に含まれるとしている。otosphere の特徴についてはこれまでいくつかの報告例があるが、大部分はまだ知られていない。そこで新生仔マウス蝸牛感覚上皮細胞を単離培養して otosphere を作製し、cDNA マイクロアレイを用いて、otosphere の遺伝子解析を行った。同様にマウス ES 細胞、蝸牛感覚上皮細胞の遺伝子解析も行い、比較を行うことで幹細胞としての性質に関連しそうな遺伝子を探索することとした。</p> <p>otosphere の培養過程で、蝸牛幹／前駆細胞から分化する細胞が増加していく。幹／前駆細胞だけをできるだけ多く集めるために、培養日数や継代のタイミングおよび分化した細胞の除去法を検討した。継代 1 回、8～10 日間の培養で、幹細胞を多く含む otosphere と分化した細胞を多く含む otosphere の大きさが有意差をもって異なることを利用して、フィルターを用いて、大部分の分化細胞の除去に成功した。集めた細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後、マイクロアレイを行った。</p> <p>otosphere は細胞塊ごとの差が大きいと言われているが、上記の処理により、相同性の高さを実現でき、otosphere に共通する遺伝子発現を再現よく検出することができた。幹細胞としての性質を調べるため、ES 細胞と蝸牛感覚上皮細胞との比較解析により otosphere と ES 細胞で発現の高い遺伝子を抽出した。これらの遺伝子について、遺伝子オントロジー (GO) 解析を行ったところ、「幹細胞らしさ」という単語を含む遺伝子オントロジーは認めなかったが、「細胞周期」にかかわる遺伝子を複数同定した。いくつかは細胞周期を抑制する働きを持つ遺伝子であり、培養の影響に関わっている可能性が示唆された。さらに転写因子の抽出を行ったところ、Trib3、Klf5、Hmga2 といった多能性に関連する転写因子を同定した。otosphere のみに高発現する転写因子も抽出し、qPCR を行って、確かに発現が高いことを確認した。</p>			

<p>otosphere に特異的に発現する転写因子は otosphere の性質を維持するのに重要な因子と考えられる。近年、複数の転写因子を体細胞に導入することにより、多能性幹細胞へのリプログラミングや別の細胞への分化転換が報告されている。今回同定された転写因子の中には otosphere への分化転換に密接に関わる遺伝子が含まれていると考えられ、今後さらなる精査を行っていきたい。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>蝸牛感覚上皮細胞を単離培養して作製される otosphere に蝸牛幹／前駆細胞が含まれていることが証明されてから、複数の研究によって otosphere の特徴が示されてきたが、まだ不明な点が多い。そこで、マイクロアレイにより otosphere の遺伝子プロファイルを調べ、otosphere の stemness（幹細胞らしさ）に関わる遺伝子を同定することとした。</p> <p>本研究では、マウス蝸牛幹／前駆細胞を内包する solid otosphere を高純度に収集できるよう培養、回収法を工夫し、得られた solid otosphere、マウス ES 細胞および蝸牛感覚上皮細胞の cDNA マイクロアレイを行った。解析の結果、otosphere は2つの細胞種から独立した群を形成し、かつ相同性の高いサンプルであった。遺伝子発現の比較解析を行い、ES 細胞かつ otosphere で高発現する多数の遺伝子を抽出した。GO 解析では stemness という用語を含む GO term は存在しなかったが、転写因子に相当する GO term を検索することで、ES 細胞の stemness に関する報告がある転写因子が複数同定された。また、その中には蝸牛にも発現が認められる転写因子もあり、otosphere の stemness に関わっている可能性がある。以上の研究は蝸牛幹／前駆細胞の遺伝子発現の解明に貢献し、感音難聴の研究の発展に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 1 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降